

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini termasuk pada jenis penelitian deskriptif. Menurut Nazir (1998) penelitian deskriptif dilakukan bertujuan untuk menggambarkan fakta dan karakteristik objek serta subjek secara sistematis yang diteliti secara tepat.

B. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada 20 November 2017 hingga 30 Januari 2018 yang bertempat di Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), *Cibinong Science Center* (CSC).

C. Alat dan Bahan

Penelitian ini membutuhkan alat dan bahan untuk mendukung berjalannya proses overproduksi, karakterisasi dan analisis efisiensi purifikasi. Alat dan bahan tersedia di Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin Pusat Penelitian Bioteknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), *Cibinong Science Center* (CSC). Daftar alat dan bahan tercantum pada **Lampiran 1 dan Lampiran 2**.

D. Prosedur Penelitian

Penelitian ini menggunakan beberapa prosedur penelitian untuk mencapai hasil yang diinginkan. Tahap pertama yang dilakukan adalah inokulasi *Pichia pastoris* Rekombinan pada media YPD, selanjutnya masuk pada tahap overproduksi skala 3 ml. *Dot Blot* dan *Western Blot* dilakukan setelah overproduksi untuk *screening* tahap awal dan dilanjutkan dengan overproduksi skala 50 ml. Tahap selanjutnya yaitu purifikasi yang kemudian akan dikarakterisasi menggunakan metode *Western Blot*. Sampel dari

purifikasi juga akan di uji dengan metode ELISA. Prosedur penelitian secara lengkap diuraikan dibawah ini.

1. Inokulasi *Pichia pastoris* HSA-IFN SMD1168 pada media YPD & YPDS

Laboratorium Protein Terapeutik dan Vaksin Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI memiliki *Pichia pastoris* HSA-IFN SMD1168 klon no1. Sebelum masuk ke tahap overproduksi, *Pichia pastoris* HSA-IFN SMD1168 klon no1 di inokulasi ke dalam media YPD (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 2% *dextrose* 20% dan aquades) kemudian diinkubasi selama 24 jam 250 rpm pada suhu 30 °C. Kultur dari YPD di *streak* kedalam media YPDS (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 2% *dextrose* 20%, 2% agar, aquades dan Zeocin 25 µg/ ml). Kemudian kultur *Pichia pastoris* dikultivasi dalam medium YPDS diinkubasi selama 24 jam 250 rpm pada suhu 30°C.

2. Overproduksi Protein Fusi *Human Interferon-α2a Human Serum Albumin* Skala 3 ml

Kultur *Pichia pastoris* HSA-IFN SMD1168 yang sudah diinkubasi, diambil koloni tunggal dan ditumbuhkan dalam 3 ml media BMGY (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 1,34% *Yeast Nitrogen Base*, 1% gliserol, 10% *potassium phosphate*, 0,2% biotin dan aquades) (Merck, Jerman). Kultur diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm. Pemanenan dilakukan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Pelet kemudian disuspensikan kedalam 3 ml medium BMMY (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 1,34% *Yeast Nitrogen Base*, 1% MeOH, 10% potasium fosfat, 0,2% biotin dan aquades) (Merck, Jerman). Kultur kemudian di inkubasi selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm. Sebelum masuk tahap induksi, dilakukan pemberian enzim anti protease sebanyak 0,1 gram untuk 50 ml. Pada jam ke-24 dilakukan induksi melalui penambahan 100% metanol dengan konsentrasi akhir 2% (Merck, Jerman) ke dalam kultur, kemudian inkubasi

selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm. Kultur masuk tahap pemanenan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil untuk proses *screening*.

3. Karakterisasi Protein Fusi *Human Interferon-α2a Human Serum Albumin* dengan Metode *Dot Blot* dan *Western Blot* (Screening Tahap Awal)

Screening tahap awal dilakukan dengan metode *Dot Blot* dan *Western Blot*. Tahapan pertama adalah dimana supernatan diteteskan pada membran *nitrocellulose* (GE healthcare™, Swedia). Proses blocking dilakukan dengan direndamnya membran *nitrocellulose* dengan susu skim (10% skim dalam TBS 1x) selama satu jam, kemudian dilakukan *washing* (TBS 1x tween 0,1%) selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Setelah proses *washing* membran *nitrocellulose* direndam dengan antibodi primer yaitu *Mouse anti-Human Interferon-α2a* selama 1 jam, kemudian di cuci kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Selanjutnya membran *nitrocellulose* direndam dengan antibodi sekunder yaitu *Mouse anti-Mouse IGG AP Conjugate* selama 1 jam, kemudian dicuci kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Masuk pada proses pewarnaan, ditambahkan air sebanyak 4 ml, BCIP 500 µl dan MBK 500 µl. Warna ditunggu hingga tervisualisasi.

Pada metode *Western Blot* Pertama sampel dibuat gel poliakrilamid (Bio-Rad, USA) yang tersusun atas *separating gel* 12% (30% *Acrylamide*, 1,5 M Tris pH 8,8, APS, SDS 10%, temed dan aquades) dan *stacking gel* 4% (30% *Acrylamide*, 1,5 M Tris pH 6,8, APS, SDS 10%, temed dan aquades) digunakan untuk analisis SDS-PAGE. Supernatan sebanyak 15 µl dihomogenkan dengan 5 µl Comassie brilliant blue (Bio-Rad, USA), sedangkan kontrol sebanyak 5 µl dihomogenkan dengan 5 µl *Comassie brilliant blue* (Bio-Rad, USA) untuk memberi warna pada proses SDS-PAGE. Setelah dihomogenkan

dilakukan pemanasan pada suhu 95 °C selama 5 menit. *Ladder*, kontrol, sampel IFN- α 2a dimasukkan kedalam sumur gel. Sampel kemudian masuk tahap *running* selama 90 menit dengan voltase 120 volt menggunakan *running buffer* (trisma base, glisin, SDS, ddH₂O). penempelan gel dilakukan dengan membran *nitrocelulose* kemudian masuk tahap *running* selama 90 menit dengan voltase 120 volt menggunakan *transfer buffer* (trisma base, glisin, SDS, metanol, ddH₂O)

Gel dibuang, kemudian proses *blocking* dilakukan dengan direndamnya membran *nitrocelulose* dengan susu skim (10% skim dalam TBS 1x) selama satu jam, kemudian dilakukan *washing* (TBS 1x tween 0,1%) selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. larutan dibuang pada masing-masing waktu. Setelah proses *washing* membran *nitrocelulose* direndam dengan antibodi primer yaitu *Mouse anti-Human Interferon- α 2a* selama 1 jam, kemudian *washing* kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Selanjutnya membran *nitrocelulose* direndam dengan antibodi sekunder yaitu *Mouse anti-Mouse IGG AP Conjugate* selama 1 jam, kemudian *washing* kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Masuk pada proses pewarnaan, ditambahkan air sebanyak 4 ml, BCIP 500 μ l dan MBK 500 μ l. warna ditunggu hingga muncul.

4. Overproduksi Protein Fusi Human Interferon- α 2a Human Serum Albumin Skala 50 ml

Setelah dipastikan bahwa kultur mengekspresikan protein lewat proses *screening*, dilanjutkan dengan overproduksi skala 50 ml. Kultur *Pichia pastoris* HSA-IFN SMD yang sudah diinkubasi, diambil koloni tunggal dan ditumbuhkan dalam 50 ml media BMGY (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 1,34% *Yeast Nitrogen Base*, 1% gliserol, 10% *potassium phosphate*, 0,2% biotin dan aquades) (Merck, Jerman). Diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm. Setelah diinkubasi, dilakukan pemanenan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 250

rpm selama 5 menit. Pelet kemudian disuspensi kedalam 50 ml medium BMMY (1% *Yeast extract*, 2% pepton, 1,34% *Yeast Nitrogen Base*, 1% MeOH, 10% potassium fosfat, 0,2% biotin dan aquades) (Merck, Jerman). Kultur kemudian di inkubasi selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm, pada jam ke-24 dilakukan induksi melalui penambahan 100% metanol dengan konsentrasi akhir 2% (Merck, Jerman) ke dalam kultur, kemudian inkubasi selama 24 jam dalam suhu 30 °C dan kecepatan 250 rpm. Sebelum masuk tahap induksi, dilakukan pemberian enzim anti protease sebanyak 0,1 gram untuk 50 ml. Kultur masuk tahap pemanenan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 250 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil untuk proses purifikasi.

5. Purifikasi Protein Fusi Human Interferon- α 2a Human Serum Albumin

Supernatan yang sudah dipisahkan kemudian difiltrasi kedalam tabung *Minimate™ Tangential Flow Filtration* (Pall, USA) bisa dilihat pada **Gambar 3.1** dengan menggunakan membran *Molecular Weight Cut off* (MWCO) yang berukuran 10kDa. Sampel yang berjumlah 50 ml dipekatan menjadi 10 ml pada proses filtrasi. Pada saat selesai filtrasi, sampel diambil sebanyak 1 ml untuk karakterisasi.

Selanjutnya dipurifikasi pada kolom yang berisi *Blue Sepharose™* (GE Healthcare, Swedia), kolom dibilas menggunakan aquades hingga habis, kemudian dibilas menggunakan larutan PBS 1x (KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, ddH₂O). Sampel dimasukan sebanyak 9 ml kedalam kolom, setelah sampel habis dimasukan PBS1x (KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄.H₂O, ddH₂O) kedalam kolom, setelah habis kemudian ditambahkan elution *buffer* (2 M NaCl dalam PBS 1x), hasilnya kemudian ditampung ke dalam mikrotube 1,5 ml. Dari proses purifikasi didapatkan 2 sampel yaitu TFF HSA-IFN SMD sampel pada saat filtrasi dan eluat HSA-IFN SMD sampel hasil akhir dari purifikasi.



Gambar 3.1 *Minimate™ Tangential Flow Filtration*
(Pall, 2007)

6. Karakterisasi Protein Fusi Human Interferon- α 2a Human Serum Albumin dengan Metode Western Blot

Western Blot merupakan metode untuk deteksi dan karakterisasi protein. Protein tersebut akan dideteksi oleh antibodi spesifik untuk mendapatkan protein yang diinginkan. Berbeda dengan *Dot Blot*, *Western Blot* melalui tahap elektroforesis sehingga dapat digunakan sebagai metode untuk karakterisasi bobot molekul protein.

Pertama sampel hasil pemekatan dengan filtrasi yaitu TFF HSA-IFN SMD) dan hasil purifikasi yaitu eluat HSA-IFN SMD dikarakterisasi menggunakan metode *Western Blot*. Gel poliakrilamid (Bio-Rad, USA) yang tersusun atas *separating gel* 12% (30% *Acrilamide*, 1,5 M Tris pH 8,8, APS, SDS 10%, temed dan aquades) dan *stacking gel* 4% (30% *Acrilamide*, 1,5 M Tris pH 6,8, APS, SDS 10%, temed dan aquades) digunakan untuk analisis SDS-PAGE. Sampel sebanyak 15 μ l dihomogenkan dengan 5 μ l *Comassie brilliant blue* (Bio-Rad, USA), sedangkan kontrol sebanyak 5 μ l dihomogenkan dengan 5 μ l *Comassie brilliant blue* (Bio-Rad, USA untuk memberi warna pada proses SDS-PAGE. Setelah dihomogenkan dilakukan pemanasan pada suhu 95 °C

selama 5 menit. Ladder dimasukan, kontrol, sampel TFF HSA-IFN SMD dan eluat HSA-IFN SMD kedalam sumur gel. Sampel kemudian masuk tahap *running* selama 90 menit dengan voltase 120 volt menggunakan *running buffer* (trisma base, glisin, SDS, ddH₂O). Penempelan gel dilakukan dengan membran *nitrocelulose* kemudian masuk tahap *running* selama 90 menit dengan voltase 120 volt menggunakan *transfer buffer* (trisma base, glisin, SDS, metanol, ddH₂O)

Gel dibuang, kemudian proses *blocking* dilakukan dengan direndamnya membran *nitrocelulose* dengan susu skim (10% skim dalam TBS 1x) selama satu jam, kemudian dilakukan *washing* (TBS 1x tween 0,1%) selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Setelah proses *washing* membran *nitrocelulose* direndam dengan antibodi primer selama 1 jam, kemudian *washing* kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Selanjutnya membran *nitrocelulose* direndam dengan antibodi sekunder selama 1 jam, kemudian *washing* kembali selama 15 menit, 5 menit dan 5 menit. Larutan dibuang pada masing-masing waktu. Masuk pada proses pewarnaan, ditambahkan air sebanyak 4 ml, BCIP 500 µl dan MBK 500 µl. warna ditunggu hingga muncul.

7. Analisis Semi Kuantitatif dengan ImageJ dan Photo Capt

Analisis dilakukan dengan *software* ImageJ untuk mendapatkan nilai ketebalan pita berdasarkan ketebalan *pixel* gambar dan luas area pita. Sedangkan Photo Capt bertujuan untuk mengetahui besar bobot molekul sampel berdasarkan nilai Rf dengan pembanding bobot molekul marker.

8. Pengukuran Konsentrasi Protein Fusi Human Interferon- α 2a Human Serum Albumin dengan Metode ELISA

ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) menggunakan Human IFN- α ELISA kit (VeriKine™, USA) dan menggunakan teknik sandwich immunoassay untuk pengukuran secara kuantitatif dari IFN- α

pada media. Sampel TFF HSA-IFN SMD dan eluat HSA-IFN SMD masing masing diencerkan sebesar 10x, 50x dan 100x. *Blank* dan standar 1-6 disiapkan. 950µl standar *solution* ditambahkan untuk standar ke-6, 600 µl untuk standar ke-5 dan 500 µl untuk standar ke-5, ke-4, ke-3, ke-2, ke-1 dan *blank*. Kemudian 500 µl dilution *buffer* ditambahkan kedalam standar ke-6, 200 µl kedalam standar ke-5, 100 µl kedalam standar ke-4, 50 µl kedalam standar ke-3, 25 µl kedalam standar ke-2 dan 12,5 µl kedalam standar ke-1. Dari tabung standar diambil sebanyak 50 µl kemudian dipindahkan ke standar ke-6, dari standar ke-6 diambil sebanyak 400 µl kemudian dipindahkan ke standar ke-5, dari standar ke-5 dipindahkan ke standar ke-4, standar ke-4 dipindahkan ke standar ke-3, perpindahan dilakukan secara berturut-turut hingga standar ke-1 yang masing-masing diambil sebanyak 500 µl

100 µl standar 1-6, *blank* dan sampel pada sumur yang ada di plate dimasukan dengan pembagian untuk *blank* 2 sumur, masing-masing standar 2 sumur dan masing-masing sampel 1 sumur, kemudian diinkubasi selama 1 jam dalam keadaan tersegel, setelah satu jam dibilas menggunakan *washing buffer* sebanyak 1x (1:20 *washsolutionconcentrate*, ddH₂O) (VeriKine™, USA). 100µl Dilute AB *Solution* (27µl AB *solution* ditambahkan *solution buffer* hingga 2 ml) (VeriKine™, USA) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur, diamkan 1 jam dengan keadaan tertutup, setelah satu jam dibilas menggunakan *washing buffer* sebanyak 3x (1:20 *washsolution concentrate*, ddH₂O) (VeriKine™, USA). 100 µl Dilute HRP *Solution* (20 µl HRP ditambahkan *solution buffer* hingga 2 ml) ditambahkan ke dalam masing-masing sumur, diamkan 1 jam dengan keadaan tertutup, setelah satu jam dibilas menggunakan *washing buffer* sebanyak 4x (1:20 *washsolution concentrate*, ddH₂O) (VeriKine™, USA). 100 µl Dilute TMB *Solution* ditambahkan ke dalam masing-masing sumur, diamkan 15 menit dalam keadaan gelap dan tidak tersegel, kemudian 100 µl stop *solution* ditambahkan kedalam masing-masing sumur. Pada tahap akhir

plate dibaca menggunakan *microplatereader* dengan nilai absorbansi 450 nm sekitar 5 menit setelah *stop solution* ditambahkan.